



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی اثر عصاره خام بیوسورفکتانت تولید شده توسط سویه باکتریایی
باسیلوس آتروفوس بر بیوفیلم تولید شده توسط سویه های باکتریایی بالینی

توسط :

آرمیتا صدیقی

اساتید راهنما :

دکتر حمید فروتن فر

دکتر مجتبی شکیبایی

استاد مشاور:

دکتر محمد حسن مصحفی

شماره پایان نامه: ۸۶۰

تابستان ۱۳۹۵



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Pharmacy

For the certificate of Pharm. D. Degree

Title:

**Evaluation the effect of crude biosurfactant produced by *Bacillus atrophaeus*
on the biofilm produced by clinically isolated bacterial strains**

By:

Armita Sedighi

Supervisors:

Hamid Forootanfar

Mojtaba Shakibaie

Advisor:

Dr. Mohammad Hasan Moshafi

Summer 2016

Thesis No: 860

خلاصه

مقدمه: تشکیل بیوفیلم توسط سویه های پاتوژن به یکی از معضلات مهم علم پزشکی در چند دهه اخیر تبدیل شده است، چرا که این لایه محافظتی که میتواند مانع از نفوذ بسیاری از آنتی بیوتیکها شود مشکل مقاومت میکروبی را تشدید نموده و باعث گسترش سویه های مقاوم واجد بیوفیلم شده است. استفاده از بیوسورفکتنتها و سویه های مولد آنها جهت جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و یا کاهش میزان آن یکی از کاربردهای نسبتا جدید بیوسورفکتنتهاست. هدف مطالعه حاضر بررسی میزان تشکیل بیوفیلم باکتریهای مولد بیوفیلم جدا شده از سویه های بالینی در حضور غلظتهای مختلف عصاره خام بیوسورفکتنت جدا شده از سویه *باسیلوس آتروفوس* است که اخیرا به عنوان یک سویه مولد بیوسورفکتنت از نمونه های خاک جداسازی شده است، میباشد.

روش کار: سویه باکتریایی مولد بیوسورفکتنت که اخیرا از نمونه های خاک جداسازی و به کمک روش مولکولی به عنوان *باسیلوس آتروفوس* شناسایی شده بود در محیط کشت بهینه مایع کشت داده شد و نمودار رشد، تغییر pH و کاهش کشش سطحی آن در ساعتهای مختلف رسم گردید. سوپرناتانت کشت سلول باکتریایی سپس در ساعت حداکثری کاهش کشش سطحی برداشت شد و به کمک رسوبگذاری با اسید و سپس استخراج به کمک حلال (اتیل استات:متانول ۴ به ۱) تا رسیدن به یک رسوب مناسب تغلیظ گردید. سه سویه پاتوژن *استافیلوکوک ارئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *پروتئوس میرابیلیس* که قبلا از نمونه های بالینی جدا شده بودند و تشکیل بیوفیلم آنها به اثبات رسیده بود در محیط کشت TSB حاوی یک درصد گلوکز کشت داده شد و تعداد 10^6 CFU/ml از این کشت به چاهکهای یک میکروپلیت ۹۶ خانه منتقل گردید و سپس غلظتهای مختلف بیوسورفکتنت به

چاهکهای مربوطه اضافه گردید و میزان تشکیل بیوفیلم به کمک روش تثبیت و سپس رنگ آمیزی به کمک کریستال ویوله تعیین مقدار گردید.

نتایج: منحنی رشد باکتری مولد بیوسورفکتنت نشان داد که بیشترین کاهش کشتش سطحی در ساعت ۲۴ کشت مشاهده میگردد. تغلیظ، رسوبگذاری و استخراج مایع کشت سویه باسیلوس آتروفوس به ۰/۲۷۴ گرم بیوسورفکتنت منجر شد که سپس غلظتهای ۲۰۰۰۰ تا ۱ میکروگرم در میلی لیتر از این عصاره خام بیوسورفکتنت تهیه گردید. ارزیابی اثر گلوکز بر میزان تشکیل بیوفیلم سویه های پاتوژن مولد بیوفیلم نشان داد که غلظت ۱ درصد گلوکز مناسبترین غلظت جهت تشکیل حداکثر میزان بیوفیلم میباشد. بررسی میزان تشکیل بیوفیلم در حضور غلظتهای مختلف بیوسورفکتنت نشان داد که بیوسورفکتنت خام ناشی از سویه باسیلوس آتروفوس قادر به مهار تشکیل بیوفیلم سویه های پاتوژن نبوده است که این امر احتمالاً به دلیل ناخالص بودن بیوسورفکتنت بوده است که نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

کلمات کلیدی: بیوسورفکتنت، بیوفیلم، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس آتروفوس

Abstract

Introduction: Biofilm formation is a very important medical challenge which many investigations focused on it to find a way to combat it. Microbial strains are protected in biofilm and many microbial drug resistances develop in biofilm structure. Application of biosurfactant to prevent or reduce biofilm formation is a novel usage of these microbial derived molecules. The main of the present study was to evaluate the anti-biofilm activity of the crude extract of biosurfactant produced by *Bacillus atrophaeus* recently isolated from soil samples.

Methods: The *Bacillus atrophaeus* strain was cultivated in TSB broth and the related change in OD₆₀₀ and pH as well as surface tension of the culture broth was measured to attain the most appropriate time to reach the highest biosurfactant production. The culture broth was then removed and acidified using HCl to reach pH 2 followed by addition of organic solvent (ethyl acetate: methanol 4:1) to concentrate and give the biosurfactant crude extract. The clinically isolated biofilm-producing bacterial strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis* were cultivated in TSB broth medium supplemented by glucose 1% to reach 1.5×10^8 CFU/ml. Thereafter, an amount of 10^6 CFU/ml was added to related well of a 96-well microplate and designed concentrations of biosurfactant was added and incubated at 37 C. The amount of biofilm formed was measured using standard crystal violet staining method and recording the related absorbance at 570 nm.

Results: The related growth curve of the *Bacillus atrophaeus* showed that the surface tension was maximally reduced after 24 h cultivation. Acid precipitation of culture broth gives an amount of 0.274 g crude extract of biosurfactant. Evaluation the effect of glucose concentration biofilm formation of pathogenic strains revealed that biofilm was

maximally formed in the presence of 1% glucose. The obtained results of antibiofilm activity of the crude extract of biosurfactant showed that biosurfactant was ineffective to inhibit biofilm formation. It seems that impurity of crude biosurfactant negatively affected the anti-adhesive of it which needs further investigations.

Keywords: Biosurfactant, Biofilm, *Bacillus atrophaeus*, *Pseudomonas aeruginosa*